带有丝素重链信号肽序列的家蚕丝胶蛋白启动子驱动 DsRed 的瞬时分泌表达

彭　云, 潘远旺, 钱琰琰, 郑清银, 姜　岚, 曹广力, 薛仁宇, 贡成良*

(苏州大学医学部基础医学与生物科学学院, 江苏苏州 215123)

摘要: 为了探讨家蚕 *Bombyx mori* 丝素蛋白重链信号肽序列在中部丝腺组织中是否具有功能活性,根据家蚕丝蛋白基因的启动子活性高、丝蛋白具有高效分泌的特性,构建了带有丝素重链基因 *fib-H* 信号肽的家蚕丝胶-1(*ser-1*)启动子(*ser-HS*),用 *ser-HS* 驱动 DsRed 基因构建了分泌型瞬时表达载体 pSK-SerHS-DsRed-polyA。转染细胞实验显示,该载体能在家蚕 BmN 细胞中瞬时表达 *DsRed*。家蚕注射载体后,可在中部丝腺腔中检测到红色荧光,表明瞬时表达的 DsRed 已分泌到丝腺腔内。据此提出克隆的 *fib-H* 信号肽序列在家蚕中部丝腺组织中具有信号肽的功能。

关键词: 家蚕; 丝胶启动子; 丝素重链基因; 信号肽; *DsRed*; BmN 细胞; 丝腺

中图分类号: Q966　　**文献标识码**: A　　**文章编号**: 0454-6296(2009)11-1177-06

Transiently secretory expression of DsRed driven by sericin promoter with the signal peptide sequence of fibroin H chain of *Bombyx mori*

PENG Yun, PAN Yuan-Wang, QIAN Yan-Yan, ZHENG Qing-Yin, JIANG Lan, CAO Guang-Li, XUE Ren-Yu, GONG Cheng-Liang* (School of Pre-clinical Medicine and Biological Science, Medical College, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

Abstract: To verify whether the signal peptide sequence of fibroin H chain (fib-H) functionally possesses the activity in the middle silk gland, based on the characteristics of the strong promoter of the silk protein gene and the high level secretion of silk protein of the silkworm, *Bombyx mori*, we constructed the promoter *ser-HS* of sericin-1 gene (*ser-1*) with the signal peptide sequence of *fib-H*. Then, we constructed the transitorily secretory expression vector pSK-serHS-DsRed-polyA *via* driving the DsRed gene with the promoter *ser-HS*. We transfected pSK-serHS-DsRed-polyA into BmN cells by liposome. From the cells transfected with the vector, the red fluorescence could be detected, which verified that the expression vector could express *DsRed* in BmN cells transiently. Furthermore, when silkworm had been injected with the expression vector pSK-serHS-DsRed-polyA, red fluorescence could be observed in the lumen of the middle silk gland of silkworm. The results indicated that *DsRed* was expressed transiently and was secreted into the lumen of the middle silk gland. We concluded that the cloned signal peptide sequence of *fib-H* possesses the biological functions of the signal peptide in the middle silk gland.

Key words: *Bombyx mori*; sericin promoter; fibroin H chain; signal peptide; *DsRed*; BmN cell; silk gland

家蚕 *Bombyx mori* 是最早的人工饲养的经济昆虫之一,其丝腺是合成和分泌蚕丝蛋白的器官,具有强大的生产蛋白质和分泌蛋白质的能力。家蚕的生长周期一般是25 d 左右,在幼虫期约摄入桑叶22 g,可合成并分泌出0.5 ~ 1 g 的蚕丝蛋白 (吕鸿声, 1990)。

蚕丝蛋白由丝素(fibroin, fib)和丝胶(sericin, ser)组成。丝素由重链(heavy chain, fib-H)、轻链(light chain, fib-L)和 Fhx/P25(fibrohexamerin)以摩尔比6:6:1 组成(Inoue *et al.*, 2000)。丝胶蛋白包裹在丝芯蛋白的外侧,丝芯蛋白与丝胶蛋白的重量比约为75:25(Garel *et al.*, 1997)。丝蛋白启动子是自然界中最强的启动子之一,它作为家蚕丝腺生物反应器候选启动子已引起了广泛的关注,并已以丝蛋白基因的启动子控制外源基因成功实现了外源基因在家蚕丝腺组织中的表达(Okamoto *et al.*, 1982; Tomita *et al.*, 2003, 2007; Royer *et al.*, 2005; Hino

基金项目: 国家“大学生创新性实验计划”实验项目(57315752); 国家重点基础研究发展规划项目(“973”计划项目)(2005CB121000)
作者简介: 彭云, 男, 1987 年 9 月生, 云南开远人, 本科生, 主要从事家蚕分子生物学研究, E-mail: caesarandandy@163.com
*通讯作者 Author for correspondence, Tel.: +86-0512-65880183; Fax: +86-0512-65880183; E-mail: gongcl@suda.edu.cn
收稿日期 Received: 2009-08-03; 接受日期 Accepted: 2009-10-15

et al., 2006)。通过融合分泌表达策略可以实现重组蛋白分泌到丝腺腔,并提高重组蛋白的表达水平。Kurihara 等(2007) 将猫科动物干扰素(FeIFN)基因与 fib-H 的 N 端、C 端融合, 在转基因家蚕的后部丝腺融合分泌表达了 FeIFN, 生物学活性实验表明:融合表达产物几乎没有活性, 但经蛋白酶水解去掉两端的 fib-H 多肽序列后则表现出很高的活性。由于丝芯蛋白不溶于水,从蚕茧层纯化重组蛋白需用硫氰酸胍和硫氰酸锂等强离液盐(strong chaotropic salts)处理,从而导致重组蛋白大部分失去生物学活性(Tomita *et al.*, 2007)。丝胶蛋白具有良好的亲水性(Garel *et al.*, 1997),因此将重组蛋白分泌到丝胶层具有明显的优越性。

丝胶蛋白基因(*ser*)在基因组中为单一拷贝,但可以转录形成多种编码丝胶蛋白的 mRNA(Michaille *et al.*, 1986)。*ser-1* 基因的结构已有较详细的研究(Michaille *et al.*, 1986; Garel *et al.*, 1997; 诸戌娴等, 2007),*ser-1* 启动子的活性与家蚕肌动蛋白 A3 启动子的活性相当(Tomita *et al.*, 2007)。为了利用 *ser-1* 基因启动子实现外源基因的分泌表达, 人们对 ser-1 信号肽序列进行了研究, 尝试通过控制引导外源蛋白质分泌表达的 N 端信号肽的氨基酸数目, 研究重组蛋白的分泌与信号肽的切割(Guo *et al.*, 2005, 2008)。当 ser-1 信号肽长度缩短到 14 个氨基酸残基时, 仍能引导重组蛋白分泌至腺腔,而当信号肽长度缩短至 13 个氨基酸残基时,重组蛋白的分泌就不完全(Guo *et al.*, 2008)。茧丝中,丝素蛋白的含量是丝胶蛋白的 3 倍,丝素蛋白基因 *fib-H* 启动子是自然界中最强的启动子之一,该基因的信号肽(fib-HS)具有强大的分泌能力。有研究表明, 当 fib-HS 长度缩短到 16 个氨基酸残基的时候, 仍具有引导重组蛋白分泌的功能, 且信号肽的切割位点位于 S16 的羧基端(Wang *et al.*, 2006a, 2006b)。

为了探讨利用 *ser-1* 启动子和 *fib-H* 基因的信号肽序列实现重组蛋白分泌到中部丝腺腺腔,本实验以带有 *fib-HS* 的 *ser-1* 的启动子控制 DsRed 报告基因的分泌型瞬时表达载体 pSK-SerHS-DsRed-polyA, 初步探讨了重组蛋白在培养细胞和丝腺组织的分泌表达, 希望为利用 *ser-1* 启动子实现外源基因在家蚕丝腺组织的分泌表达提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒和菌株:质粒 pBluescriptII SK (+)、pSK-ser (带有 *ser-1* 启动子序列)(诸戌娴等, 2007)、含有 DsRed-polyA 元件的质粒 pSK-ser-DsRed-polyA(带有 DsRed 基因和家蚕丝素蛋白轻链基因的加尾信号序列)(诸戌娴等, 2007)、受体菌为 *E. coli* TG1、家蚕 BmN 细胞株为苏州大学医学部分子生物实验室保存; 家蚕皓月品种为江苏省无锡蚕种公司馈赠, PMD-19 载体为上海生工生物工程有限公司产品。

1.1.2 试剂:限制性内切酶 *Sal* Ⅰ、*Hin*d Ⅲ、*Eco*R Ⅰ、*Xba* Ⅰ、Taq DNA 聚合酶为 GIBICO BRL 公司产品; T4 DNA 连接酶、TC-100 培养基、胎牛血清(FBS)为 GIBICO BRL 公司产品; 脂质体转染试剂(RNAi-Mate)为 GenePhama 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计与合成:为了利用 *ser-1* 启动子和 *fib-H* 的信号肽序列实现在中部丝腺细胞合成的重组蛋白分泌到丝腔,根据家蚕 *ser-1* 启动子序列(诸戌娴等, 2007)和家蚕丝素重链基因(*fib-H*)的信号肽序列(GenBank accession no. AF226688)设计 3 个特异性引物,即:TS-ser-1: cctctagagaattc**gcacacacactacatacc**(下划线分别示 *Xba* Ⅰ、*Eco*R Ⅰ位点,黑体示 *ser-1* 基因 −521 ~ −504 区域的序列), Ser-S1: gcacaagatcacaaaggttttgactctcatGTTGGCGGTCTTTG (小写字母所示序列与 *fib-H* 基因信号肽 DNA 1 ~ 30 区域的序列互补,大写字母所示序列与丝胶启动子 +35 ~ +54 区域的序列互补(诸戌娴等, 2007), Ser-S2-2: TTAAGCTTGGATCCgacatactgcagagcgcagcacaagatcacaaag(下划线分别示 *Hin*d Ⅲ /*Bam*H Ⅰ位点,小写字母所示序列与 *fib-H* 基因信号肽 DNA 15 ~ 48 区域的序列互补),引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2.2 带有 *fib-H* 信号肽序列的 *ser-1* 启动子的合成:以 pSK-ser(诸戌娴等, 2007)为模板,以 *ser-1* 启动子的上游引物(TS-ser-1)和 Ser-S1 引物进行 PCR,以回收的 PCR 产物为模板,用 TS-ser-1 和 Ser-S2-2 引物进行 PCR,PCR 产物回收后,克隆进 PMD-19T 载体获 pMD-serHS,并进行测序验证。

1.2.3 pSK-serHS-DsRed-polyA 瞬时表达载体的构建:测序正确的克隆 pMD-serHS 经 *Xba* Ⅰ、*Bam*H Ⅰ双酶切,回收带有 *fib-H* 信号肽序列的 *ser-1* 启动子,克隆进 pBlueScript II (+)的 *Xba* Ⅰ和 *Bam*H Ⅰ位点,获 pSK-serHS 质粒; 用 *Sal* Ⅰ和 *Kpn* Ⅰ双酶切质粒 pSK-ser-DsRed-polyA(诸戌娴等, 2007),并回收纯化 DsRed-polyA (约 1.0 kb)片段,定向克隆进用

同样的酶切的 pSK-serHS 中获 pSK-serHS-DsRed-polyA。质粒图谱如图 1 所示。

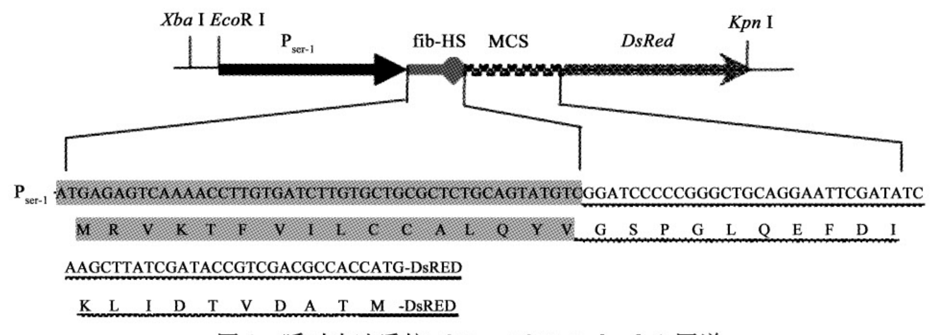


图 1　瞬时表达质粒 pSK-serHS-DsRed-polyA 图谱

Fig. 1 Map of transient expression vector pSK-serHS-DsRed-polyA

P_{ser-1}：*ser-1* 基因启动子 Promoter of *ser-1* gene；fib-HS：丝素重链信号肽 Signal peptide of fibroin H chain；MCS：多克隆位点 Multiple clone site；*DsRed*：DsRed 基因 DsRed gene. 阴影示 *ser-1* 信号肽核苷酸序列及其对应的氨基酸序列，波浪线示载体的多克隆位点及其对应的氨基酸序列，下划线示 DsRed 序列。The nucleotide sequence of *ser-1* signal peptide and its corresponding amino acid sequence are shaded; vector MCS and its corresponding amino acid sequence are denoted with wave line; underline shows DsRed sequence.

1.2.4　脂质体介导法细胞转染：按常规方法（Summers and Smith，1987）培养 BmN 细胞，以脂质体介导法进行细胞转染（Tang *et al.*，2003）。以 10^6 个细胞/mL 密度将 BmN 细胞铺于 12 cm^2 的细胞瓶中，26℃ 培养过夜。取 2 个 Eppendorf 管（A、B 管），A 管加入瞬时表达质粒 pSK-serHS-DsRed-polyA（2.5 μg），以 TC-100 培养基（FBS Free）将总体积补至 100 μL，混匀备用；B 管加入脂质体 2.5 μL，以 TC-100 培养基（FBS Free）将总体积补至 100 μL。将 A、B 二管混合并混匀，室温静置 30 min 备用。取已贴壁的细胞，弃旧培养基，用无血清 TC-100 培养基洗细胞 2 次，每次用 1 mL，逐滴加入 200 μL混合转染液，再加 0.9 mL 无血清 TC-100 培养基。4 h 后，弃掉旧培养基，加入 2 mL 含有 10% FBS TC-100 培养基，24 h 后用荧光显微镜（Nikon，TE2000-U）观察细胞荧光情况。

1.2.5　蚕幼虫的的注射：脂质体与 pSK-serHS-DsRed-polyA 混合，以 5 μg/头注射进 4 龄幼虫的第 4 腹节体腔。1 d 后解剖取中部丝腺，用荧光显微镜观察拍照，并轻拉断丝腺，观察丝腺内分泌物荧光情况。同设空载体 pSK-serHS 对照。

2　结果与分析

2.1　pSK-serHS-DsRed-polyA 瞬时表达载体的鉴定

为了获得带有 *fib-H* 信号肽序列的 *ser-1* 启动子，按方法 1.2.2 的策略得到 pMD-serHS 重组质粒，测序结果（图 1）显示，*fib-H* 信号肽序列已按要求置于 *ser-1* 启动子的下游；用带有 fib-H 信号肽序列的 *ser-1* 启动子控制 DsRed 基因构建了瞬时表达载体 pSK-serHS-DsRed-polyA。用 *Kpn* Ⅰ 和 *Xba* Ⅰ，*Sal* Ⅰ 和 *Kpn* Ⅰ，*Xba* Ⅰ 和 *Bam*H Ⅰ 双酶切 pSK-serSH-DsRed-polyA，可分别切出 1.6，1.0，0.6 kb 的特异性片段，与预计的分子量一致，表明带有 *fib-H* 信号肽序列的 *ser-1* 启动子控制 DsRed 基因的表达盒已按要求克隆进 pBluescript II SK(+) 载体。

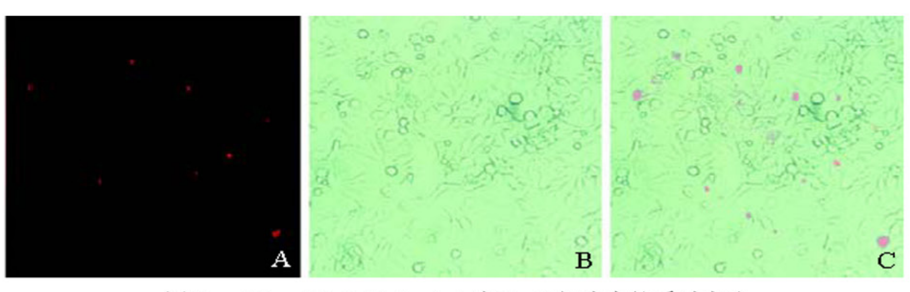


图 2　pSK-serHS-DsRed-polyA 在 BmN 细胞中的瞬时表达

Fig. 2 Transient expression of pSK-serHS-DsRed-polyA in BmN cells

A：荧光视野 Fluorescence image；B：正常视野 Normal image；C：荧光和正常视野重叠 Overlap of fluorescence and normal image.

2.2 带有 *fib-H* 信号肽序列的 *ser-1* 启动子在 BmN 培养细胞中的活性检测

pSK-serHS-DsRed-polyA 转染 BmN 细胞(图 2) 24 h 后,可检测到部分转染细胞表现出红色荧光,表明 DsRed 基因已按要求正确克隆进信号肽序列下游,并与信号肽序列在同一读码框里融合,在培养细胞中启动了该基因的正确表达,带有 *fib-H* 信号肽序列的 *ser-1* 启动子在家蚕卵巢细胞中具有启动子活性。在转染 36 和 48 h, 仍可观察到荧光,而 72 h 后荧光细胞明显减少, 荧光强度显著减弱,到 96 h 几乎观察不到荧光细胞。

2.4 带有 *fib-H* 信号肽序列的 *ser-1* 启动子驱动 DsRed 基因在家蚕丝腺中的瞬时表达

家蚕品种"皓月"饲养至 4 龄,按上述 1.2.5 方法注射载体 24 h 后,解剖取其丝腺,用镊子轻轻地扯拉中部丝腺管壁,暴露出中部丝腺细胞层断面和其丝腺腔内容物,荧光显微镜下观察。结果如图 3 所示,家蚕注射(图 3:C)或未注射(图 3:A)瞬时表达载体的中部丝腺在正常光线下均未见红色荧光,未注射瞬时表达载体的家蚕中部丝腺(图 3:B)和注射空载体 pSK-serHS 家蚕中部丝腺在荧光视野中有弱背景荧光,而家蚕注射 pSK-serHS-DsRed-polyA 的中部丝腺细胞中可见明显的红色荧光,丝腺管腔的内容物也有明显的红色荧光(图 3:D)。诸戌娴等(2007)的研究结果显示注射 pSK-ser-DsRed-polyA(无信号肽序列的 *ser-1* 启动子控制 DsRed 的瞬时表达载体)家蚕的中部丝腺细胞显示出明显的红色荧光,但丝腺腔内容物不呈现荧光。因此可以认为注射 pSK-serHS-DsRed-polyA 后,在中部丝腺细胞中表达的 DsRed 是在 fib-H 信号肽的引导下分泌至丝腺腔内。

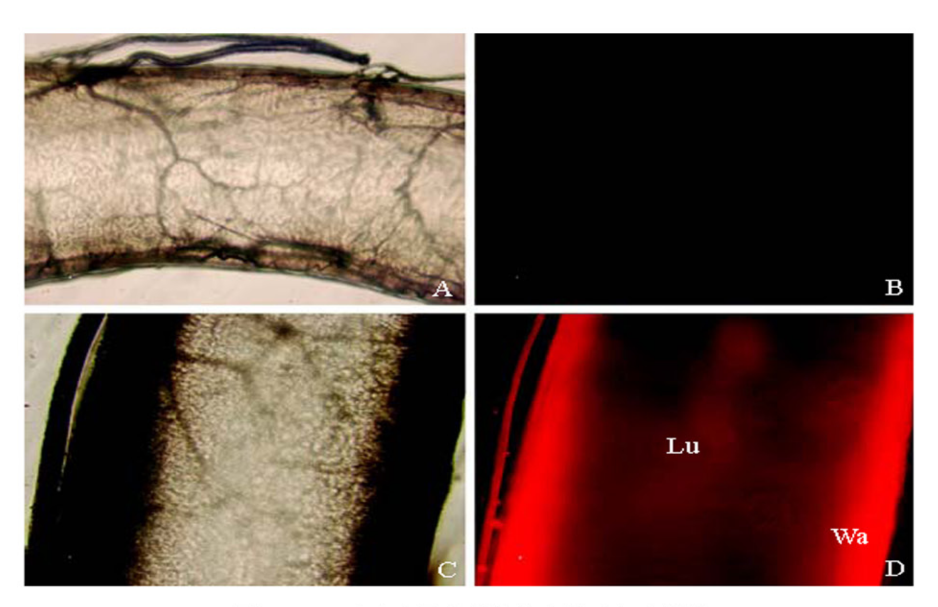


图 3 DsRed 在家蚕中部丝腺中瞬时表达检测

Fig. 3 Detection of transient expression of DsRed in middle silk gland under microscope

A, C: 正常视野 Normal image; B, D: 荧光视野 Fluorescence image; A, B: 正常中部丝腺 Normal middle silk gland; C, D: 注射 pSK-FibHS-DsRed-polyA 的中部丝腺 Middle silk gland injected with pSK-serHS-DsRed-polyA. Wa: 中部丝腺管壁(丝腺细胞层) Wall of middle silk gland tube (cell layer of silk gland); Lu: 中部丝腺腺腔 Lumen of middle silk gland.

3 讨论

通过瞬时表达来分析启动子元件的活性是一种快捷有效的方法。Adachi 等(2006)用果蝇热休克蛋白基因(*hsp*)启动子控制的荧光素酶报告基因(*luc*)构建瞬时表达载体 pHspLuc,以基因枪法体外导入家蚕 5 龄幼虫丝腺,并移植至蚕体,3 d 后根据 Luc 的表达水平判别启动子的活性。陆长德等利用含有丝蛋白启动子控制报告基因表达元件的重组苜蓿丫纹夜蛾核多角体病毒(*Autographa californica* nucleopolyhedrovirus, AcNPV)感染敏感家蚕,发现丝蛋白启动子可驱动报告基因在丝腺以外组织渗漏表达,信号肽序列的长度影响分泌效率(Guo *et al*., 2005; Wang *et al*., 2006a, 2006b; Liu *et al*., 2006)。我们曾用家蚕丝蛋白启动子控制 DsRed 基因构建瞬时表达载体,在脂质体的介导下,通过转染家蚕细胞或注射家蚕血液,发现 *fib-H* 启动子(周文林等, 2008)、*fib-L* 启动子(周文林等, 2007)、*ser-1* 启动子(诸戌娴等, 2007)、*Fhx/P25* 启动子(刘炜彬等,

2007）在卵巢来源的家蚕培养细胞中也有活性。本研究用带有 *fib-H* 信号肽序列的 *ser-1* 启动子控制 DsRed 基因，实现了 DsRed 基因在中部丝腺瞬时分泌表达，可以认为这一策略是鉴定启动子的特异性和信号肽分泌能力的一种快速有效方法。

业已明确，家蚕丝蛋白的大量合成和分泌通常是在家蚕 5 龄期的丝腺组织中进行，这与丝蛋白基因启动子的组织特异性和发育的时序性有关。已有的研究结果显示，*ser-1* 基因转录起点上游 －500 ～ －475 bp 一段与其表达的丝腺专一性有关（Liu *et al.*, 2006）。本实验结果显示转染表达载体 pSK-serHS-DsRed-polyA 的家蚕卵巢来源的 BmN 细胞也有一定水平的 DsRed 表达，表明丝胶基因的启动子的组织特异性也不是绝对的。启动子的组织特异性与启动子的结构有关。在 *ser-1* 基因启动子区域含有至少 3 个特异性的蛋白质结合位点：SA（ －85 ～ －103）、SB（ －135 ～ －149）和 SC（ －183 ～ －204），其中 SA 位点能被丝腺专一的转录活化因子 SGF1 结合，SB 和 SC 位点能被非丝腺专一的转录活化因子 SGF3 结合。SGF3 与 SC 位点的结合能力较强，与 SB 位点的结合能力较弱（诸戌娴等，2007），家蚕卵巢来源的 BmN 细胞可能具有部分全能性，因此，*ser-1* 启动子在 BmN 细胞中具有活性可能与 BmN 存在非丝腺专一的转录活化因子 SGF3 有关。

丝腺组织合成的丝蛋白具有强大的分泌性能。Wang 等（2006）实验证明 fib-H 信号肽的切割位置在 21 与 22 氨基酸残基之间，但当信号肽的长度缩短到 16 个氨基酸残基时候，仍具有引导重组蛋白分泌的功能，信号肽的切割位点位于 S16 的羧基端，且此切割与丝素重链蛋白 N 端的 2 个 α-螺旋、C 端肽段无关；潘兴亮等（2009）的研究也表明，带有 fib-H 信号肽 N-端 16 个氨基酸残基可引导后部丝腺瞬时表达的 DeRed 进入后部丝腺丝腔。本研究结果显示，分泌型瞬时表达载体 pSK-serHS-DsRed-polyA 注射家蚕后，可在中部丝腺腔中检测到红色荧光，表明瞬时表达的 DsRed 分泌到丝腺腔，具有 16 个氨基酸残基的 fib-HS 信号肽在中部丝腺细胞中也具有引导重组蛋白分泌到细胞外的功能，但中部丝腺细胞层的荧光强度明显高于腺腔内容物的荧光强度，可以认为具有 16 个氨基酸残基的 fib-HS 信号肽在中部丝腺细胞引导蛋白分泌的能力并不强。

参 考 文 献（References）

Adachi T, Tomita M, Shimizu K, Ogawa S, Yoshizato K, 2006. Generation of hybrid transgenic silkworms that express *Bombyx mori* prolyl-hydroxylase alpha-subunits and human collagens in posterior silk glands: Production of cocoons that contained collagens with hydroxylated proline residues. *Biotechnol.*, 126(2): 205 －219.

Garel A, Deleage G, Prudhomme JC, 1997. Structure and organization of the *Bombyx mori* sericin 1 gene and of the sericins 1 deduced from the sequence of the Ser 1B cDNA. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 27: 469 －477.

Guo X, Zhang Y, Zhang X, Wang S, Lu C, 2008. Recognition of signal peptide by protein translocation machinery in middle silk gland of silkworm *Bombyx mori*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 40(1): 38 －46.

Guo XY, Guo TQ, Wang SP, Wang JY, Lu CD, 2005. Silk gland specific secretory expression of *egfp* gene in silkworm *Bombyx mori* with rAcMNPV system. *Arch. Virol.*, 150(6): 1 151 －1 160.

Hino R, Tomita M, Yoshizato K, 2006. The generation of germline transgenic silkworms for the production of biologically active recombinant fusion proteins of fibroin and human basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 27: 5 715 －5 724.

Inoue S, Tanaka K, Arisaka F, Kimura S, Ohtomo K, Mizuno S, 2000. Silk fibroin of *Bombyx mori* is secreted, assembling a high molecular mass elementary unit consisting of H-chain, L-chain, and P25, with a 6:6:1 molar ratio. *J. Biol. Chem.*, 275(51): 40 517 －40 528.

Kurihara H, Sezutsu H, Tamura T, Yamada K, 2007. Production of an active feline interferon in the cocoon of transgenic silkworms using the fibroin H-chain expression system. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355(4): 976 －980.

Liu WB, Gong CL, Xue RY, Zhou WL, Zhou XX, Cao GL, 2007. Cloning and analysis of *Fhx/P25* gene promoter of *Bombyx mori* fibroin protein. *Zoological Research*, 28(1): 20 －22.［刘炜彬，贡成良，薛仁宇，周文林，诸戌娴，曹广力，2007. 家蚕丝蛋白 *Fhx/P25* 基因启动子区域的克隆及序列分析. 动物学研究，28(1): 20 －22］

Liu Y, Yu L, Guo X, Guo T, Wang S, Lu C, 2006. Analysis of tissue-specific region in sericin 1 gene promoter of *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 342(1): 273 －279.

Lu HS, 1990. Sericulture in China. Shanghai Science & Technology Press, Shanghai. 184.［吕鸿声，1990. 中国养蚕学. 上海：上海科学技术出版社. 184.

Michaille JJ, Couble P, Prudhomme JC, Garel A, 1986. A single gene produces multiple sericin messenger RNAs in the silk gland of *Bombyx mori*. *Biochimie*, 68(10 －11): 1 165 －1 173.

Okamoto H, Ishikawa E, Suzuki Y, 1982. Structural analysis of sericin genes: Homologies with fibroin gene in the 5′ flanking nucleotide sequences. *J. Biol. Chem.*, 257: 15 192 －15 199.

Pan XL, Cao GL, Xue RY, Gong CL, 2009. Transiently secretory expression of DsRed driven by fibroin heavy chain promoter of *Bombyx mori*. *Chinese Journal of Biotechnology*, 25(5): 761 －766.［潘兴亮，曹广力，薛仁宇，贡成良，2009. 家蚕丝素重链启动子驱动 DsRed 的瞬时分泌表达. 生物工程学报，25(5): 761 －766］

Royer C, Jalabert A, Da Rocha M, Grenier AM, Maucham PB, Couble

P, Chavancy G, 2005. Biosynthesis and cocoon-export of a recombinant globular protein in transgenic silkworms. *Transgenic Res.*, 14(4): 463－72.

Summers MD, Smith GE, 1987. A manual of methods for baculovirus vectors and insect cell culture procedures. *Texas Agricultural Experiment Station Bulletin*, 1 555: 10－18.

Tang SM, Yi YZ, Shen XJ, Zhang ZF, Li YR, He JL, 2003. Functional analysis of the larval serum protein gene promoter from silkworm, *Bombyx mori*. *Chinese Sci. Bull.*, 48(23): 2 611－2 615.

Tomita M, Hino R, Ogawa S, Iizuka M, Adachi T, Shimizu K, Sotoshiro H, Yoshizato K, 2007. A germline transgenic silkworm that secretes recombinant proteins in the sericin layer of cocoon. *Transgenic Res.*, 16(4): 449－465.

Tomita M, Munetsuna H, Sato T, Adachi T, Hino R, Hayashi M, Shimizu K, Nakamura N, Tamura T, Yoshizato K, 2003. Transgenic silkworms produce recombinant human type III procollagen in cocoons. *Nat. Biotechnol.*, 21: 52－56.

Wang SP, Guo TQ, Guo XY, Huang JT, Lu CD, 2006a. *In vivo* analysis of fibroin heavy chain signal peptide of silkworm *Bombyx mori* using recombinant baculovirus as vector. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 341(4): 1 203－1 210.

Wang SP, Guo TQ, Guo XY, Huang JT, Lu CD, 2006b. Structural analysis of fibroin heavy chain signal peptide of silkworm *Bombyx mori*. *Acta Biochim. Biophys. Sin.*, 38(7): 507－513.

Zhou WL, Cao GL, Xue RY, Yu XH, Shen WD, Gong CL, 2007. Cloning and activity analysis of the promotor of *fibroin-L* gene from the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 50(6): 547－554. [周文林, 曹广力, 薛仁宇, 虞晓华, 沈卫德, 2007. 家蚕丝素蛋白轻链基因(*fib-L*)启动子序列的克隆及其活性分析. 昆虫学报, 50(6): 547－554]

Zhou WL, Cao JR, Ye AH, Cao GL, Xue RY, Gong CL, 2008. Cloning and activity analysis of fibroin heavy-chain gene promoter of silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericologica Sinica*, 34(1): 72－77. [周文林, 曹锦如, 叶爱红, 曹广力, 薛仁宇,贡成良, 2008. 家蚕丝素蛋白H链基因启动子区域的克隆及活性分析. 蚕业科学, 34(1): 72－77]

Zhu XX, Cao GL, Xue RY, Zhou WL, Liu WB, Gong CL, 2007. Cloning and activity analysis of promoters of sericin-1 gene from *Bombyx mori*. *Bulletin of Science and Technology*, 23(6): 830. [诸戌娴, 曹广力, 薛仁宇, 周文林, 刘炜彬, 贡成良, 2007. 家蚕丝胶蛋白基因1(*ser-1*)启动子的克隆及其活性分析. 科技通报, 23(6): 830]

(责任编辑:邓艳)